

Beitrag zur Kenntnis  
der *Endothia parasitica* (Murr.) And.,  
dem Erreger des Kastaniensterbens

---

VON DER

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN  
HOCHSCHULE IN ZÜRICH

ZUR ERLANGUNG

DER WÜRDE EINES DOKTORS  
DER NATURWISSENSCHAFTEN

GENEHMIGTE

PROMOTIONSARBEIT

VORGELEGT VON

**Giovanni Bazzigher**, dipl. Ing.-Agr.  
von Vicosoprano

Referent: Herr Prof. Dr. E. Gäumann

Korreferent: Herr Prof. Dr. O. Jaag



1 9 5 3

Veröffentlicht in der „Phytopathologischen Zeitschrift“ Bd. 21, Heft 2, 1953

Aus dem Institut für spezielle Botanik  
der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich  
Direktor: Prof. Dr. E. Gäumann

## Beitrag zur Kenntnis der *Endothia parasitica* (Murr.) And., dem Erreger des Kastaniensterbens

Von

G. BAZZIGHER

Mit 27 Abbildungen und 7 Tabellen

Inhalt: A. Einleitung. — B. Über Erreger, Wirt und Krankheitsverlauf. I. Die systematische Stellung des Erregers. II. Der Wirtskreis des Erregers. III. Der Krankheitsverlauf. a) Die Infektion; b) Die Proliferation des Erregers; c) Die Erkrankung. IV. Eigene Infektionsversuche. a) Die Infektionsmethode; b) Die Infektionsversuche. — C. Wachstum und Toxinbildung des Erregers in vitro. I. Die Wachstumsbedingungen. a) Die Nährmedien; b) Die Temperatur als Wachstumsfaktor. II. Die Toxinbildung. a) Testmethoden; b) Die Bedingungen der Toxinbildung; 1. Die Ernährungsbedingungen, 2. Die Kulturdauer, 3. Die Abhängigkeit der Toxinausbeute von der Inokulummenge, 4. Die Abhängigkeit der Toxinproduktion von der Temperatur, 5. Die Beziehung zwischen pH, Wachstum und Toxinproduktion, 6. Die Toxinproduktion bei verschiedenen *Endothia*-Spezies; c) Die Isolierung des Toxins; d) Eigenschaften des Toxinrohextraktes; 1. Der Einfluß von Hitzeinwirkung und pH-Veränderung auf die Aktivität des Toxinrohextraktes, 2. Die Löslichkeit des Toxins; e) Die biologische Wirkung des Toxinrohextraktes; 1. Die Wirkung des Toxins auf verschiedene Bakterien und Pilze, 2. Die Wirkung des Diaporthins auf höhere Pflanzen. — D. Zusammenfassung. — E. Literaturverzeichnis.

### A. Einleitung

*Endothia parasitica* (Murr.) And., der Erreger des Kastanienkrebses, wurde anfangs dieses Jahrhunderts zum erstenmal in den USA festgestellt. Seit seinem ersten Auftreten bis heute hat dieser Pilz durch äußerst heftige Epidemien die Kastanien Nordamerikas praktisch zum Verschwinden gebracht und wird, soweit vorauszusehen ist, auch in Europa der *Castanea sativa* ein gleiches Schicksal bereiten. Wirksame Bekämpfungsmöglichkeiten stehen uns heute noch nicht zur Verfügung. Auf lange Sicht dürfte sich vielleicht einzig der Ersatz der anfälligen Kastanienarten durch resistenteren bewähren.

Die nachfolgende Arbeit ist als Beitrag zur Kenntnis der *Endothia parasitica* gedacht. Sie wurde dank des großzügigen Entgegenkommens von Bund und Kanton Tessin möglich. Den zuständigen Behörden und insbesondere meinem verehrten Lehrer, Herr Prof. Dr. E. GÄUMANN, möchte ich an dieser Stelle meinen besten Dank aussprechen.

## B. Über Erreger, Wirt und Krankheitsverlauf

### I. Die systematische Stellung des Erregers

Der Erreger des Kastanienkrebses wurde 1906 erstmals durch MURRILL unter dem Namen *Diaporthe parasitica* (Murrill) beschrieben (MURRILL 1906). REHM gab ihm 1907 den Namen *Valsonectria parasitica* (Murr.) Rehm (REHM 1907). Im Jahre 1912 erklärte ihn CLINTON als eine parasitische Form einer früher schon bekannten *Endothia* und nannte ihn *Endothia gyrosa* var. *parasitica* (Murr.) Clinton (CLINTON 1912). Im gleichen Jahr taufte ihn ANDERSON auf den heute noch gültigen Namen *Endothia parasitica* (Murr.) And. (ANDERSON 1912) um.

Der Kastanienkrebserreger, *Endothia parasitica*, gehört zu den *Ascomyceten* und hier innerhalb der *Diaporthales* zu den stark stromatischen Formen, welche ihre Stroma in ein konidienbildendes Ectostroma und ein peritheciensbildendes Entostroma gliedern (GÄUMANN 1949).

Es steht heute noch nicht fest, ob innerhalb der Gattung *Endothia parasitica* biologische Rassen existieren. Es wurden bis jetzt beispielsweise keine Unterschiede, weder in parasitologischer noch in toxikologischer Hinsicht, zwischen einem aus Kastanien isolierten und einem aus *Quercus* isolierten Stamm festgestellt. Dies bedeutet allerdings keineswegs eine Verneinung der möglichen Existenz solcher Biotypen bei *Endothia parasitica*.

### II. Der Wirtskreis des Erregers

Die Hauptwirte von *Endothia parasitica* gehören zu den *Fagaceae* und innerhalb dieser Familie zu der Gattung *Castanea*. Die Nebenwirte sind wohl zur Hauptsache in der Reihe der *Fagales* zu finden, doch haben sich gelegentlich auch Vertreter der *Juglandales*, der *Polycarpicae* und der *Terebinthales* als anfällig erwiesen. Diese Feststellung gilt für nordamerikanische Verhältnisse, wo infolge der viel reichhaltigeren Flora naturgemäß ein viel größeres Angebot an potentiellen Wirten bestehen muß, als dies in Europa der Fall sein kann. In Tabelle 1 sind sämtliche bis heute bekannten Wirte von *Endothia parasitica* zusammengestellt, und zwar der mutmaßlichen Anfälligkeit nach geordnet (es ist leider nicht möglich, in dieser Hinsicht exaktere Vergleiche zu ziehen). Diese Tabelle beginnt mit den hochanfälligen *Castanea*-Spezies und endet mit den sehr schwach anfälligen Vertretern der *Juglandales*, *Polycarpicae* und *Terebinthales*. Eine Mittelstellung in der Anfälligkeit nehmen *Quercus* und *Fagus* ein.

Seit einigen Jahren (BIRAGHI 1950) sind auch in Europa *Quercus pubescens* Willd., *Quercus petraea* (Mattuschka) Lieblein und *Quercus Ilex* L. als neue Wirtspflanzen von *Endothia parasitica* bekannt geworden. Im Frühjahr 1952 wurde dieser Pilz auch in verschiedenen Gegenden des Kantons Tessin auf *Quercus pubescens* und *Quercus petraea* festgestellt. Der aus krankem Eichenmaterial isolierte Erreger wurde auf Kastanien rückinfiziert, und es ergab sich in der Folge das bekannte Krankheitsbild. Das Ergebnis dieses Rückversuches läßt schließen, daß es sich um den normalen *Endothia*-Stamm

handelt, welcher bei Kastanien bekannt ist. Bei Infektionsversuchen an Eichen und Kastanien mit aus *Quercus* und aus Kastanien isoliertem Erreger konnten keine Unterschiede in bezug auf eine eventuelle Spezialisierung und auf Pathogenität festgestellt werden.

Tabelle 1

Wirtsspektrum von *Endothia parasitica*  
(Zusammenstellung verschiedener  
Literaturangaben)

---

<i>Castanea dentata</i> (Marsh.) Borkh. (2, 7, 8)
<i>Castanea sativa</i> Miller (3, 7)
<i>Castanea henryi</i> Rehd. and Wils. (7)
<i>Castanea ozarkensis</i> Ashe (7)
<i>Castanea pumila</i> (L.) Mill. (7, 8)
<i>Castanea alabamensis</i> Ashe (7)
<i>Castanea alnifolia</i> Nutt. (7)
<i>Castanea ashei</i> Sud. (7)
<i>Castanea floridana</i> (Sang.) Ashe (7)
<i>Castanea seguini</i> Dode (7)
<i>Castanea crenata</i> Sieb. and Zucc. (7)
<i>Castanea mollissima</i> Bl. (7)
<i>Castanopsis chrysophylla</i> (Hook.) DC. (5, 6, 8)
<i>Castanopsis</i> (asiatische Spezies) (5, 6)
<i>Quercus stellata</i> Wangenh. (4, 6)
<i>Quercus montana</i> Willd. (1, 6)
<i>Quercus petraea</i> (Mattuschka) Lieblein (3)
<i>Quercus pubescens</i> Willd. (3)
<i>Quercus Ilex</i> L. (3)
<i>Quercus velutina</i> Lam. (2, 9)
<i>Quercus alba</i> L. (2, 9)
<i>Quercus prinus</i> L. (2, 9)
<i>Quercus falcata</i> Michx. (9)
<i>Quercus Muehlenbergii</i> Engelm. (1)
<i>Quercus coccinea</i> Muench. (2, 9)
<i>Fagus silvatica</i> L. (eigene Infektionsversuche)
<i>Rhus typhina</i> L. (1, 2, 5, 6, 8, 9)
<i>Acer rubrum</i> L. (5, 6, 8, 9)
<i>Acer pennsylvanicum</i> L. (9)
<i>Acer saccharum</i> Marsh. (5)
<i>Acer palmatum</i> Thunb. (5)
<i>Carpinus caroliniana</i> Walt. (9)
<i>Ostrya virginiana</i> (Mill.) K. Koch (5, 9)
<i>Carya ovata</i> (Mill.) K. Koch (2, 5, 6, 8, 9)
<i>Liriodendron tulipifera</i> L. (9)

1. ANDERSON, 1913.
2. ANDERSON, 1914.
3. BIRAGHI, 1950.
4. CLAPPER, 1946.
5. DARPOUX, 1949.
6. GRAVATT, 1949.
7. GRAVES, 1950.
8. HEALD, 1943.
9. SHEAR, 1917.



Abb. 1. *Endothia*-„Krebs“ an *Quercus pubescens* Willd.  $\frac{2}{3}$  nat. Größe.

(Aufnahme: Photographisches Institut, ETH, Zürich)

Um ein etwas genaueres Bild über den Wirtskreis von *Endothia parasitica* zu bekommen, wurden Infektionsversuche an verschiedenen Waldbäumen und Sträuchern gemacht. Diese Versuche wurden im Freiland und, soweit möglich, auch unter Gewächshausbedingungen durchgeführt. Die bis jetzt vorliegenden

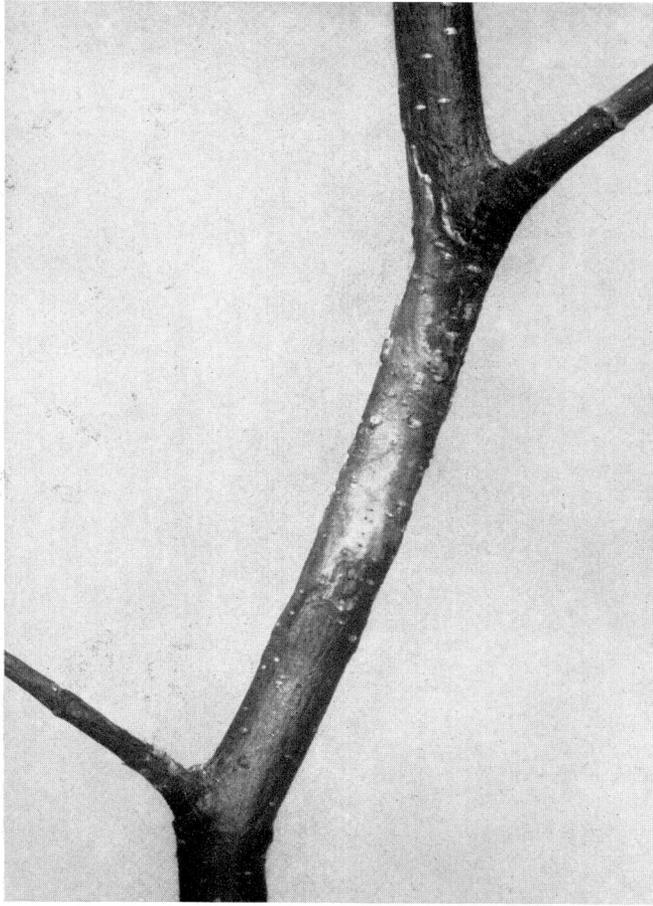


Abb. 2. *Endothia parasitica* an einem Zweig von *Fagus sylvatica* L. Dieser Zweig welkte drei Monate nach der Infektion. Die Inkubation erfolgte unter Gewächshausbedingungen.  
Nat. Größe.

(Aufnahme: Photographisches Institut, ETH, Zürich)

Ergebnisse zeigen, daß neben den erwähnten Eichenarten auch *Fagus sylvatica* L. anfällig gegenüber *Endothia parasitica* ist. Auch aus diesem Buchenmaterial wurde der Pilz isoliert und auf Kastanien mit Erfolg rückinfiziert. Abb. 1 und Abb. 2 zeigen endothiakranke Eiche und Buche.

### III. Der Krankheitsverlauf

#### a) Die Infektion

Der Propagation des Erregers stehen zwei Sporenarten zur Verfügung:

**Konidien:** Sie werden in orangefarbenen Sporenlagern, den Pyknidien, gebildet. Bei genügender Feuchtigkeit werden sie als würmchenförmige, sehr feine Sporenschnüre ins Freie gestoßen (Abb. 3). Diese Gebilde sind makroskopisch sichtbar; sie können unter Umständen mehrere Millimeter Länge aufweisen und sind aus Millionen von Sporen zusammengesetzt. Die Konidien werden vor allem durch Wind und Regen (insbesondere bei turbulenten Strömungen), ferner durch Insekten und Vögel verfrachtet. Diese Sporenart ist speziell für den Nahtransport geeignet.

**Ascosporen:** Sie werden in etwas helleren und kleineren, orangefarbenen Sporenlagern, in Perithecien gebildet. Charakteristisch für *Endothia parasitica* ist der lange Perithecienhals. Die Ascosporen werden in diesen hinausgepreßt, mittels eines speziellen Mechanismus ins Freie geschleudert und dann durch den Wind weitertransportiert. Diese Sporenart ist hauptsächlich für den Ferntransport geeignet.

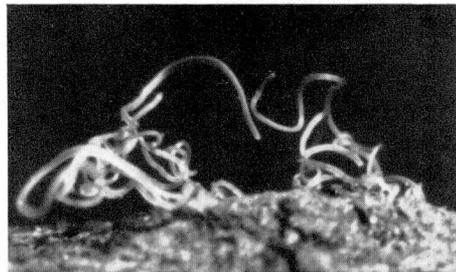


Abb. 3. Orangefarbene Sporenschnüre von *Endothia parasitica*. Vergr. etwa 20 $\times$ .  
(Aufnahme: Photographisches Institut, ETH, Zürich)

Als Eintrittspforte für den Erreger dienen Wunden ganz verschiedener Art und Herkunft. Besonders wirksam sind Quetschwunden, wie sie z. B. bei Hagelschlag entstehen, ferner Tierfraß (Insektenschäden, Wildschäden). Von der Wunde aus dringt dann der Pilz in die umliegenden Gewebe.

#### b) Die Proliferation des Erregers

Nach dem Haften der Infektion breitet sich der Pilz in den für sein Wachstum besonders geeigneten Geweben aus. Besondere Affinität besteht zum Kambium, zu den inneren Rindenpartien und zum Holz der äußeren Jahrringe. Die durchwucherten Gewebe werden außer Funktion gesetzt. Der Ausbreitung des Erregers im Wirtsinnern sind nun aber auch verschiedene Hindernisse entgegengestellt. Speziell interessiert uns hier ein Resistenzfaktor: die Tannine. NIENSTAEDT (1953) zeigte, daß Tannine durch *Endothia parasitica* in Phenole aufgespalten werden. Diese Phenole wirken unmittelbar toxisch auf den Pilz. Die Schädigung ist jedoch nicht so stark, daß er zurückgedämmt würde, vielmehr bewirkt sie nur eine Verlangsamung in der Ausbreitung des Erregers. Die unterschiedliche Resistenz von *Castanea mollissima* und *Castanea dentata* schreibt NIENSTAEDT unterschiedlicher Zusammensetzung der Tannine zu, die dementsprechend in verschieden wirksame Phenole aufgespalten werden, wobei die Phenole des *Mollissima*-Tannins toxischer wirken als die des *Dentata*-Tannins.

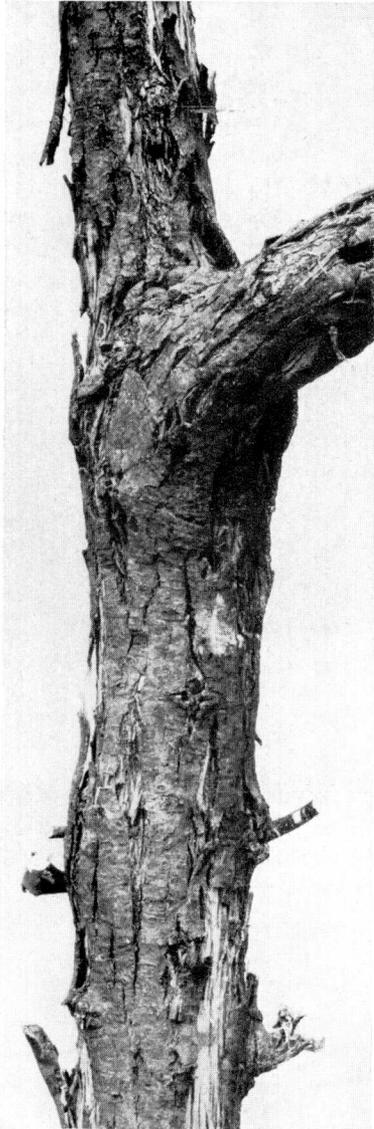


Abb. 4. Älterer, von *Endothia parasitica* infizierter Ast von *Castanea sativa*, mit aufgesprungener, zum Teil abgelöster Rinde, unter der sich die fächerförmigen Mycelmatten entwickelt haben.  $\frac{1}{5}$  nat. Größe. (Aufn.: Photographisches Institut, ETH, Zürich)

### c) Die Erkrankung

Nach ein bis zwei Monaten Inkubation erscheinen dunkel gefärbte Läsionen. Diese sind besonders auf junger glatter Rinde gut erkennbar. In einem späteren Stadium entstehen Längsrisse in der Rinde. Schließlich, je nach der Heftigkeit der Erkrankung, hypertrophiert die erkrankte Stelle oder sie sinkt ein. Es können alle Übergänge von Hypertrophie bis zu Atrophie festgestellt werden. Atrophie deutet im allgemeinen auf einen heftigen, Hypertrophie auf einen milden Krankheitsverlauf hin. — Nachträglich werden die Risse in der Rinde stärker. In diesem Zeitpunkt beginnt der Erreger zu sporulieren. — Bei älteren Ästen mit stärkerer Rinde kann die Erkrankung erst relativ spät erkannt werden. Das Aufbrechen der Rinde in Längsrissen und das darunter sichtbare, fächerartig sich verbreitende, cremefarbene Mycel nebst den meist schon in großer Anzahl vorhandenen Sporenlagern deuten auf ein schon stark fortgeschrittenes Krankheitsstadium hin (Abb. 4).

Den Abschluß der Erkrankung bildet meist das Eingehen des betroffenen Astes oder des ganzen Baumes. Nach einem eher zögernden Krankheitsverlauf welkt der Ast oder der Baum dann meist plötzlich, meist so rasch, daß die Blätter nicht mehr abgestoßen werden. — Je nach Art und Herkunft der Eintrittspforte befällt der Erreger vorwiegend die Krone oder den Stamm des Baumes. So sind Kronenerkrankungen typisch in Hagelschlaggegenden, während in anderen Gebieten dann wieder fast nur Stammerkrankungen festzustellen sind. Wie die Krankheit auch verläuft, sie endet in der Regel mit dem Eingehen eines einmal befallenen Baumes.

Nach dieser mehr übersichtsmäßigen Darstellung des Krankheitsverlaufes sind im folgenden Abschnitt noch einige eigene Infektionsversuche dargestellt.

#### IV. Eigene Infektionsversuche

Die folgenden Infektionsversuche wurden durchgeführt mit dem Ziel, Näheres über die Pathogenese zu erfahren und spezielle Hinweise für Anfälligkeitstests von Kastanienpflanzen zu erhalten.

##### a) Die Infektionsmethode

In diesen Infektionsversuchen wurde mit *Endothia parasitica*-Kulturen gearbeitet, die auf Malz-Agar (2 % Malzextrakt Wander + 1,5 % Agar in Leitungswasser) gezogen worden waren. In Petrischalen wurde auf diesen Agar unter möglichst sterilen Bedingungen ein Tropfen einer sehr dichten Konidien suspension gebracht und mit einem Glasspatel regelmäßig verstrichen. Nach 14tägiger Inkubation bei 27 ° C waren die Kulturen für die Infektionsversuche verwendbar. Nach dieser Zeit haben sich auf dem Agar eine Menge kleiner Konidienlager gebildet. Angestrebt wurde eine möglichst dichte und gleichmäßige Verteilung dieser Sporenlager über die ganze Agarfläche. Die Infektion wurde nun folgendermaßen durchgeführt: Mit einem Korkbohrer (5 mm Durchmesser) wurden die Pilzkulturen im Agar zerschnitten. Mit dem gleichen Korkbohrer wurden auch Rindenverletzungen an den zu infizierenden Kastanienpflanzen erzeugt, und zwar in der Weise, daß sich die ganze Rinde bis aufs Kambium ablösen ließ. Die herausgestanzten Pilzkulturen wurden in diese Wunden gebracht (Mycel holzwärts). Um ein zu rasches Austrocknen des Inokulums zu verhindern, dichtete man die Infektionsstelle anschließend mit Cellophan-Selbstklebeband ab.

##### b) Die Infektionsversuche

###### Versuch 1

**Versuchsfrage:** Hat das Alter oder die Dicke des infizierten Astes einen Einfluß auf den Infektionserfolg und auf die Erkrankung?

**Versuchsanordnung:** Elf Bäume (etwa sechs- bis achtjährige Kastanienpflanzen) wurden an möglichst vielen verschiedenen Stellen unter möglichst vergleichbaren Bedingungen mit *Endothia parasitica* infiziert. Infektion: 31. März 1952; Kontrolle: 7. August 1952.

**Versuchsergebnis:** In den Ergebnissen zeigt es sich, daß weder Astdicke noch das Alter des Holzes einen Einfluß auf die Proliferation des Erregers haben. Der Infektionserfolg ist überall gesichert. Der Erreger wächst im allgemeinen im ganzen Baum mit gleichgroßer Geschwindigkeit. Eine Ausnahme machte in diesem Versuch Baum Nr. 348 mit einer deutlichen partiellen Resistenz (Abb. 5). In die Breite wächst der Pilz durchschnittlich 50 % langsamer als in die Länge, wie dies auch spätere Versuche zeigen werden. Dieser Wachstumsunterschied dürfte in histologischen und zytologischen Gegebenheiten des Wirtsgewebes liegen. — Für das Absterben eines infizierten Astes ist das Breitenwachstum des Pilzes maßgebend. Das Welken erfolgt, nachdem der Erreger den Ast in seinem ganzen Umfange erfaßt hat. Als Maß für die Anfälligkeit von Kastanien gegenüber *Endothia* dürfte vor

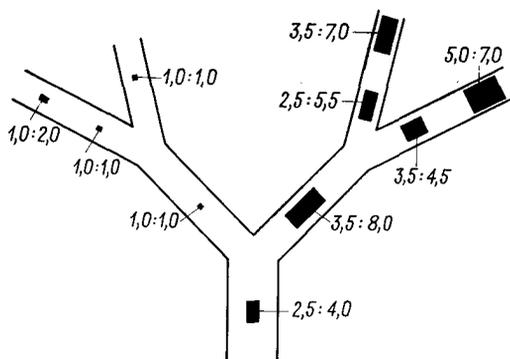


Abb. 5. Beispiel eines Baumes mit partieller Resistenz. In diesem Schema ist die Verteilung der verschiedenen Infektionsstellen ersichtlich. Die entstandenen Läsionen sind als schwarze Flächen dargestellt (die Zahlen geben das Verhältnis der Läsionsbreite zur Läsionslänge in cm ausgedrückt an)

allein die Geschwindigkeit der Ausbreitung des Erregers im Wirt (die Proliferation) heranzuziehen sein. Wir können auf die Krankheitsdauer abstellen, d. h. die Zeit, die zwischen Infektion und Krankheitsende (zwischen Infektion und Welke) liegt. In diesem Falle müssen wir Bezug nehmen auf die Astdicke. Eine andere Möglichkeit ist das direkte Ausmessen der entstandenen Läsionen zu beliebiger Zeit während der Krankheitsdauer. In diesem zweiten Falle brauchen wir nicht auf die Astdicke Bezug zu nehmen.

## Versuch 2

**Versuchsfrage:** Spielt das Alter des Inokulums für das Gelingen der Infektion eine Rolle?

**Versuchsanordnung:** Baum Nr. 331 bis einschließlich Nr. 339 wurden je an zwei Stellen am Stamm infiziert (Infektionsstelle „oben“ mit je einer 20 Tage alten Kultur, vorwiegend Mycel mit wenig Sporenlager;

Tabelle 2

Der Einfluß des Inokulumalters auf die Proliferation des Erregers

Baum Nr.	Mittlerer Durchmesser des Baumes bei den Infektionsstellen in cm	Läsionen in cm			
		„oben“ 20 Tage alte Kultur		„unten“ 50 Tage alte Kultur	
		Länge	Breite	Länge	Breite
331 Ast 1	2,7	11,0	5,5	2,0	1,5
Ast 2	4,0	6,0	3,0	3,0	2,0
332	2,6	7,0	5,0	5,0	2,5
333	2,7	10,0	6,5	1,0	1,0
334	3,0	10,0	5,0	2,0	1,5
335	4,0	11,0	5,0	1,0	1,0
336	3,5	17,0	11,0	1,0	1,0
337	1,5	2,0	1,0	0,5	0,5
338	3,2	11,0	6,5	5,5	5,0
339	1,8	9,0	5,0	1,5	1,0
S	29,0	94,0	58,5	22,5	17,0
S/10	2,9	9,4	5,9	2,3	1,7
in Prozenten		100 %	100 %	24 %	29 %

Infektionsstelle „unten“ mit einer 50 Tage alten Kultur mit viel Sporenlagern. Die Infektionen wurden unter sonst gleichen Bedingungen durchgeführt).

Versuchsergebnis: Wir sehen aus den Ergebnissen (Tabelle 2), daß das Alter des Inokulums wichtig ist für das unmittelbar folgende Wachstum des Erregers. Alte *Endothia*-Kulturen zeigen eine deutliche Virulenzverminderung. Im angeführten Versuch sind die Läsionen, bei Verwendung alten Inokulums, etwa 70—75 % kleiner als bei Benutzung junger Kulturen für die Infektion.

Tabelle 3

Der Einfluß der Verwundung verschiedenartiger Gewebe auf die Infektion und Erkrankung

Baum Nr.	Durchmesser des Baumes an der Infektionsstelle in cm	Rindenverletzung Läsion in cm		Kambium freigelegt Läsion in cm		Holzverletzung Läsion in cm	
		Länge	Breite	Länge	Breite	Länge	Breite
311	4,0	5,0	2,5	11,0	9,5	9,0	6,5
312	5,0	4,0	2,0	12,0	8,5	7,0	4,0
313	2,7	5,0	2,5	12,0	5,0	6,0	4,0
314	3,0	2,0	1,0	10,0	5,0	2,0	1,0
315	2,0	6,5	6,5	11,0	7,5	10,0	6,5
316	3,0	6,0	2,0	11,0	8,5	5,0	4,0
317	4,0	4,0	2,0	11,0	7,5	7,0	4,5
318	3,7	4,5	3,0	10,0	6,0	7,0	5,0
321	3,2	6,5	3,5	10,0	7,0	9,0	6,0
324	3,6	4,0	2,0	10,0	8,0	8,0	6,0
325	3,2	10,0	4,0	14,0	9,0	5,0	3,5
326	2,2	6,5	4,0	14,0	6,0	5,5	4,5
327	4,5	7,0	3,0	13,0	8,5	8,0	2,5
329	3,3	7,0	4,5	10,0	8,0	6,5	2,5
S	47,4	78,0	42,5	159,0	105,0	95,0	60,5
S/14	3,4	5,5	3,0	11,5	7,5	6,8	4,3
Länge/Breite in Prozenten		10	5,5	10	6,5	10	6,3
Länge		48 %		100 %		59 %	
Breite			40 %		100 %		57 %

Sporenbildung	keine	häufig	selten
Krankheitsbild	Läsionsstelle undeutlich abgegrenzt. Feine Risse in der Rinde, die jedoch nicht bis zum Kambium reichen.	Läsionsstelle meist eingefallen. Risse in der Rinde bis aufs Holz. Mycel sichtbar. Rund um die eingefallene Läsionsstelle oft stimuliertes Gewebe.	Läsionsstelle oft durch Kallus überwallt. Kleinere bis größere Risse in der Rinde bis ans Holz. Mycel oft sichtbar.

## Versuch 3

**Versuchsfrage:** Gibt es Unterschiede in der Erkrankungsweise bei Verwundung verschiedenartiger Gewebe (Rinde, Kambium, Holz)?

**Versuchsanordnung:** 19 Kastanienbäume (Alter etwa sechs bis acht Jahre) wurden am Stamm an je drei Stellen mit einer *Endothia*-Kultur (drei Wochen alt) infiziert. Infektion: 31. März 1952; Kontrolle: 7. August 1952.

- a) Obere Infektionsstelle: nur Rindenverwundung (äußere Rindenpartie);
- b) mittlere Infektionsstelle: Kambium freigelegt;
- c) untere Infektionsstelle: Verwundung bis ins Holz.

**Versuchsergebnisse:** Vier Monate nach der Infektion waren schon fünf Bäume nach einer heftigen Erkrankung eingegangen. Bei all diesen fünf konnte festgestellt werden, daß die Infektion b) dieses Eingehen verursachte, denn unterhalb dieser Läsion war das Holz noch frisch, oberhalb dagegen dürr. — Auch sämtliche anderen Versuchsbäume zeigten, obschon noch nicht abgestorben, dieselbe Tendenz, nämlich, daß die Infektionsstelle b) weitaus am stärksten erkrankt war. Durch das Ausmessen der Läsionen wurde es möglich, die Unterschiede in der Proliferation des Erregers in Zahlen zu erfassen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

## Versuch 4

**Versuchsfrage:** Welches sind die jahreszeitlich bedingten Schwankungen in der Infektionsanfälligkeit von *Castanea sativa* gegenüber *Endothia parasitica*?

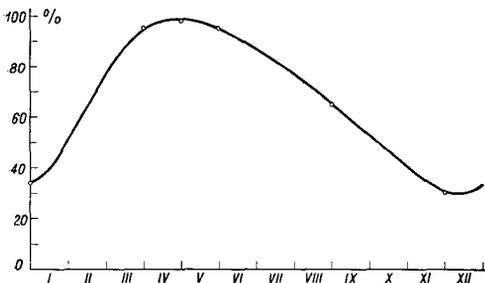


Abb. 6. Die jahreszeitlich bedingten Schwankungen in der Infektionsanfälligkeit von *Castanea sativa* gegenüber *Endothia parasitica*.

Abszisse: Jahreszeit, in welcher die Infektion erfolgte.

Ordinate: Infektionserfolg in Prozenten nach siebenmonatiger Inkubation

**Versuchsanordnung:** Zu verschiedenen Jahreszeiten wurde jedesmal eine größere Anzahl (je etwa 15 bis 20 Pflanzen) von möglichst gleich alten und gleich starken Kastanienpflanzen mit *Endothia* infiziert und jeweils sieben Monate nach erfolgter Infektion kontrolliert.

**Versuchsergebnisse:** Aus der Abb. 6 geht hervor, daß *Castanea sativa* im Frühjahr am anfälligsten für Infektionen durch *Endothia parasitica* ist.

## Versuch 5

**Versuchsfrage:** Welches sind die jahreszeitlich bedingten Schwankungen in der Krankheitsanfälligkeit von Kastanien gegenüber *Endothia*

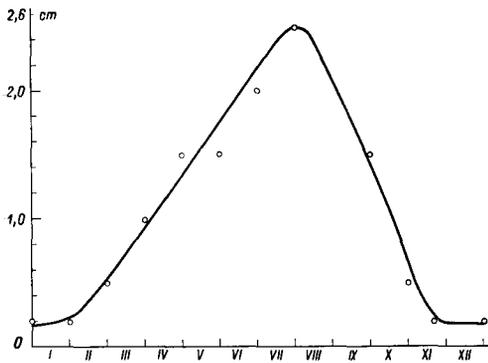


Abb. 7. Zuwachsschwankungen von *Endothia parasitica* an *Castanea sativa* im Laufe eines Jahres.

Abszisse: Jahreszeit, in der die Wachstumskontrollen durchgeführt wurden.

Ordinate: Zuwachs des Pilzes (Läsionslänge) unter der Rinde

*parasitica*, bzw. welches sind die Schwankungen in der Proliferation des Erregers?

Versuchs anordnung: Für diesen Versuch wurden periodische Kontrollen der Versuchsobjekte von Versuch 4 durchgeführt.

Versuchsergebnisse: Abb. 7 zeigt diese jahreszeitlich bedingten Schwankungen. Das Proliferationsoptimum liegt in der heißesten Jahreszeit.

### Versuch 6

Versuchsfrage: Besteht ein Zusammenhang zwischen der Reaktionsweise (Hypertrophie — keine Hypertrophie) und der Läsionslänge?

Versuchs anordnung: Bäume, die im Frühjahr 1951 mit *Endothia parasitica* infiziert worden waren, wurden im Herbst 1952 kontrolliert, die entstandenen Läsionen ausgemessen und die Reaktionsweise festgestellt.

Versuchsergebnisse: Aus den Versuchsergebnissen war ersichtlich, daß keine Beziehung zwischen Läsionsgröße und Reaktionsweise besteht. In einigen Fällen reagierten die betreffenden Bäume an allen Infektionsstellen in ein und derselben Art und Weise; bei anderen Pflanzen konnte man jedoch die verschiedensten Reaktionen feststellen, so daß es schwierig ist, eine Gesetzmäßigkeit aus diesen Ergebnissen herauszulesen. Es sei hier beigefügt, daß, wie dies ein anderer Versuch zeigte, im Anfangsstadium der Krankheit eine solche Beziehung zwischen Proliferation und Reaktionsweise zu existieren scheint, die jedoch schon ziemlich bald verwischt wird. Vorerst dürften mit Hypertrophie verbundene Abwehrkräfte den Pilz leicht hemmen, doch gewinnt das pathogene Agens nach einer gewissen Zeit die Oberhand; die anfängliche Verzögerung wird dann meist wieder eingeholt.

## C. Wachstum und Toxinbildung des Erregers in vitro

### I. Die Wachstumsbedingungen

#### a) Die Nährmedien

Der Pilz läßt sich auf verschiedenen Nährmedien kultivieren. Tabelle 4 zeigt das Wachstum von *Endothia parasitica* auf verschiedenen flüssigen Substraten. Wie Versuche zeigten, eignete sich als fester Nährboden am besten Malzagar (Malzextrakt Wander 2 % + Agar 1,5 % + Leitungswasser).

Tabelle 4  
Das Wachstum von *Endothia parasitica* auf verschiedenen  
flüssigen Nährmedien

Nährsubstrat	Wachstum + = gut - = kein	0 = Wachstum an der Oberfläche s = submerses Wachstum
KYG-Lösung = KNOPSche Lösung + 0,5 % Difco Yeast Extrakt + 2 % Glucose	+++++	0
MK-Lösung = KNOPSche Lösung + Extrakt von 1 % Malzkeimlingen + 2 % Glucose	+++	0-s
M-Lösung = Malzextrakt Wander 2 % + HOH	++	0-s
CW <sub>4</sub> -Lösung = CZAPEK (+ Watteextrakt + 4 % Saccharose)	+	s
DP-Lösung = Difco-Dextrose-Pepton	+	0-s
R-Lösung = RAULINSche Nährlösung	+	s
F II-Lösung = FRIES II Nährlösung	-	
Ri <sub>5</sub> -Lösung = RICHARDSche Nährlösung mit 5 % Saccharose	-	
Nährbouillon (Liebigbouillon 1 T + Fleischbouillon 1 T)	-	

### b) Die Temperatur als Wachstumsfaktor

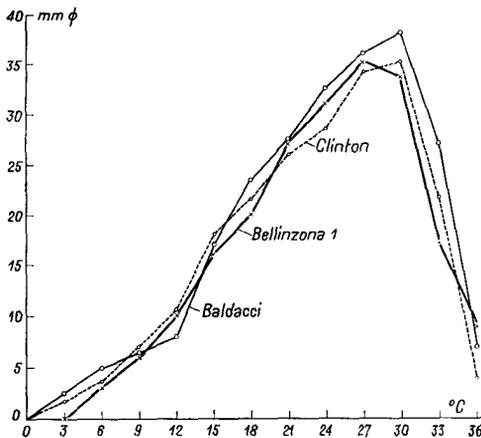


Abb. 8. Die Abhängigkeit des Wachstums von *Endothia parasitica* von der Temperatur.

Abszisse: Temperatur °C.

Ordinate: Koloniedurchmesser in mm

65 Petrischalen wurden mit Malzagar je in der Mitte mit *Endothia parasitica* beimpft, einen Tag bei 24 °C stehengelassen und anschließend immer je fünf Schalen im Thermostaten von 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 37 °C gestellt. Nach drei Tagen Wachstum wurden die Durchmesser der Kolonien bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 8 dargestellt. Dieser Versuch wurde gleichzeitig mit drei verschiedenen *Endothia parasitica*-„Stämmen“ durchgeführt, einem Stamm tessinischer Provenienz (BELLINZONA 1), einem Stamm aus Italien (Stamm BALDACCII) und einem amerikanischen Stamm (CLINTON).

## II. Die Toxinbildung

### a) Testmethoden

Das hier zur Diskussion stehende *Endothia*-Toxin kann mit folgenden Tests nachgewiesen werden: dem Welketest, dem Bakterientest und Tests mit Pilzen. Für den Welketest hat sich unter den verschiedenen möglichen Testobjekten *Solanum Lycopersicum L.* am besten bewährt, unter den Bakterientests der Plattentest mit *Bacillus subtilis*.

Das Toxin wird in der vorliegenden Arbeit *Diaporthin* genannt. Die Zugehörigkeit der *Endothia parasitica* zu den *Diaporthales* (somit die nahe Verwandtschaft zu *Diaporthe*) und die ursprüngliche Bezeichnung des Erregers als *Diaporthe parasitica* (Murrill) rechtfertigen diese Bezeichnung des *Endothia*-Toxins.

### Der Welketest mit *Solanum Lycopersicum L.*

Junge Tomatensprosse mit einem durchschnittlichen Gewicht von etwa 2 g werden in die verschiedenen Stufen einer Verdünnungsreihe des Toxins gestellt. (Diese Reihe besteht aus Verdünnungsstufen 1,  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$ ,  $\frac{1}{16}$  usw.) Die Pflanzen werden so lange in diesen Lösungen gelassen, bis 1 ml davon aufgenommen worden ist; hernach werden sie in Leitungswasser gestellt. 24 Stunden nach Beginn des Versuches werden die Pflanzen bonitiert. Das Toxin verursacht eine Stengelschädigung (Abb. 22), die bei höheren Konzentrationen sämtliche, bei schwächeren Konzentrationen nur die Basis-Partien erfaßt. Die geschädigten Partien sind in der Regel ziemlich scharf von den nichtgeschädigten abgegrenzt, so daß die kollabierten Anteile ohne Schwierigkeit in Prozenten ausgedrückt werden können. Als Schwellenwert für die Beurteilung wurde in allen Versuchen ganz willkürlich eine Schädigung des Stengels auf 30 % seiner Länge gewählt. Die getestete Lösung enthält so viele Toxineinheiten, wie der reziproke Wert der Verdünnung aufweist, die eine 30 %ige Schädigung hervorruft. Diese Anzahl Einheiten gelten für 1 ml aufgenommene Toxinlösung auf annähernd 2 g Pflanzenfrischgewicht. Aus Zweckmäßigkeitsgründen ist es angebracht, diesen Wert auf 1 g Pflanzenfrischgewicht zu beziehen, er muß also mit der Zahl, die das effektive Gewicht der getesteten Pflanze ausdrückt, multipliziert werden. Die Definition einer Toxineinheit wäre also folgende:

1 Diaporthin-Einheit = die Menge Toxinrohextrakt, welche in 1 ml Lösung von 1 g Pflanze (Frischgewicht) aufgenommen, an dieser Pflanze eine Schädigung des Stengels auf 30 % seiner Länge hervorruft.

Ist der Gewichtsanteil an Toxinrohextrakt einer Lösung bekannt, so wird die Aktivität ausgedrückt in der Dosis minima für eine 30 %ige Schädigung des Stengel für 1 kg Pflanzenfrischgewicht (aufgenommene Menge an Toxinrohextrakt je g Pflanze  $\times$  1000). Indem wir die Aktivität in Dosis minima ausdrücken, haben wir annähernde Vergleichsmöglichkeiten mit anderen Welketoxinen (GÄUMANN, NAEF-ROTH, REUSSER, AMMANN 1952). In Abb. 9 wird das Ergebnis verschiedener voneinander unabhängiger Versuche in einer Durchschnittskurve dargestellt; es ist eine angenäherte Standardkurve. Abb. 9

und 10 sind vergleichbar, da die Ergebnisse dieser Tests aus gleichzeitig durchgeführten Versuchen mit identischen Toxinlösungen erhalten wurden.

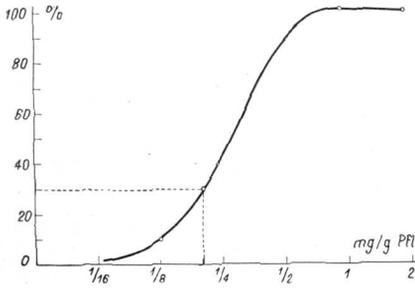


Abb. 9. Die Abhängigkeit der Aktivität des Diaporthins im Welketest von der Toxinkonzentration (angenäherte Standardkurve; vgl. Abb. 10).

Abszisse: mg Toxinrohextrakt, das von 1 g Pflanze (*Solanum lycopersicum*) aufgenommen wurde.

Ordinate: Stengelschädigung in Prozenten

### Der Bakterientest

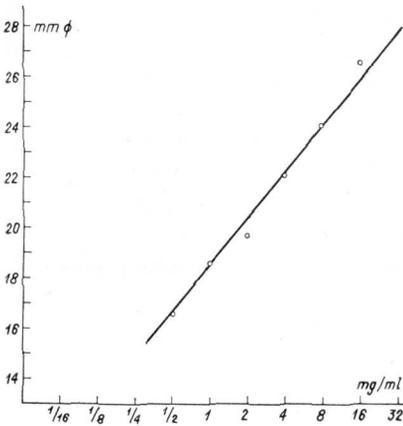


Abb. 10. Die Abhängigkeit der Aktivität des Diaporthins von dessen Konzentration im *Bacillus subtilis*-Plattentest.

Abszisse: mg Diaporthin-Rohextrakt im ml Testlösung.

Ordinate: Hemmung von *Bacillus subtilis* im Filterscheibentest.

Das Diaporthin wirkt auch auf verschiedene Bakterien. Für Testzwecke hat sich der Plattentest mit *Bacillus subtilis* als der günstigste bewährt. Es ist ein Bakterientest, der für den Nachweis verschiedener Antibiotica eingeführt wurde. Hierzu werden Petrischalen mit einem speziellen Agar-Nährsubstrat, das die *Subtilis*-Sporen in gleichmäßiger Verteilung enthält, verwendet. Sporenmenge und Dicke der Suspensionsschicht u. a. sind für die Vergleichbarkeit der Testresultate wichtig. — Auf diese so vorbereiteten Schalen (die eine be-

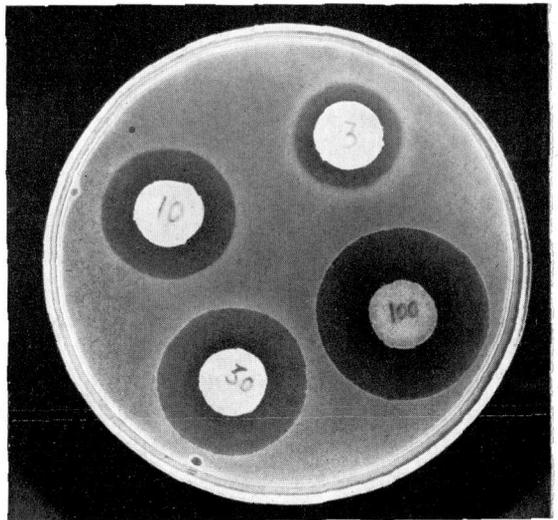


Abb. 11. Die Hemmung von *Bacillus subtilis* durch das Diaporthin.  $\frac{2}{3}$  nat. Größe

schränkte Zeit in Vorrat gehalten werden können) werden Filterscheibchen, die in der Toxinlösung getränkt worden waren, gelegt und hernach bei 37° C inkubiert. Der Durchmesser der entstandenen Hemmungszone wird sodann ausgemessen (Abb. 11). Um die Beziehung zwischen der Konzentration und der Aktivität im *Subtilis*-Test und im Welke-Test zu eruieren, wurden bei allen Welkeversuchen die verschiedenen Verdünnungen des Toxins auch mit diesem Bakterientest geprüft. Abb. 10 zeigt die so entstandene Standardkurve, die mit derjenigen von Abb. 9 vergleichbar ist.

Die beiden besprochenen Testmethoden haben sich für unseren Fall am besten bewährt. In der Folge sind noch zwei Tests mit Pilzen erwähnt:

**Der *Ustilago zaeae*-Sporenkeimungstest:** Dieser Test wurde nach der üblichen Methode von KERN (KOBEL 1951) durchgeführt. Ein Testergebnis ist in Abb. 12 dargestellt.

**Der Mycelwachstumstest nach GROSSER (1947) mit *Rhizoctonia solani* Kühn Stamm GRODSINSKY.** Ein entsprechendes Testergebnis zeigt Abb. 13.

Obwohl sich diese beiden Testmethoden mit Pilzen recht gut für den Nachweis des Diaporthins eignen, wurden sie aus arbeitstechnischen Gründen für die weiteren Versuche nicht verwendet.

## b) Die Bedingungen für die Toxinbildung

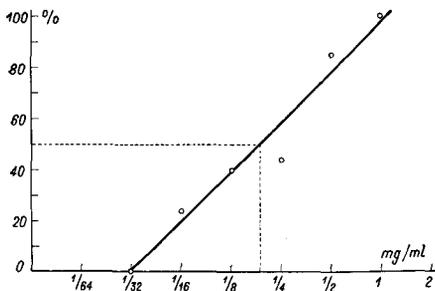


Abb. 12. Die Beziehung der Konzentration des Diaporthins zur Aktivität im *Ustilago zaeae*-Sporenkeimungstest.

Abszisse: mg Diaporthin im ml Testlösung.  
Ordinate: Keimungshemmung in Prozenten

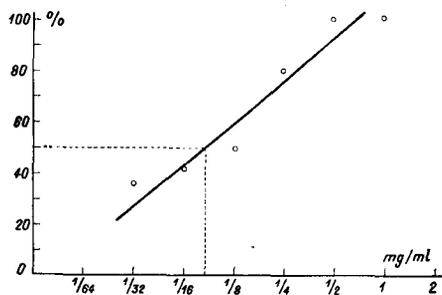


Abb. 13. Die Beziehung der Konzentration des Diaporthins zur Aktivität im Mycelwachstumstest.

Abszisse: mg Diaporthin im ml Testlösung.  
Ordinate: Hemmung von *Rhizoctonia solani* Kühn Stamm Grodsinsky

### 1. Die Ernährungsbedingungen

In ersten Versuchen sollte geklärt werden, ob *Endothia parasitica* unter speziellen Bedingungen ein Welketoxin zu bilden vermag. Wir haben ja bei der Kultur von Pilzen auf künstlichen Nährmedien nie die natürlichen Bedingungen des Wirt-Erreger-Verhältnisses. Aus diesem Grunde haben die negativen Ergebnisse der Versuche, die diese Frage der Toxinbildung klären sollten, kein Gewicht.

*Endothia parasitica* wurde auf verschiedenen Nährlösungen (siehe Tabelle 4) kultiviert, und die verschiedenen Kulturfiltrate wurden auf eine eventuelle Toxinbildung hin geprüft (siehe Testmethoden). Es zeigte sich, daß der Pilz einzig (innerhalb der untersuchten Nährmedien) auf der KYG-Nährlösung (= KNOPSche Lösung + 0,5 % Difco Yeast Extrakt + 2 % Glucose) und auf der MK-Nährlösung (= KNOPSche Lösung + Extrakt von 1 % Malzkeimlingen + 2 % Glucose) Toxin in nachweisbaren Mengen zu bilden imstande ist. Allem Anschein nach braucht er spezielle Wuchsstoffe für dessen Bildung. Außer den beiden erwähnten Nährsubstraten besitzen die andern Lösungen diese Wirkstoffe nicht. Tabelle 5 illustriert die Toxinbildung auf KYG und MK (vgl. Tabelle 4). Das Toxin wird sowohl in Schüttel- als auch in Standkultur gebildet.

Tabelle 5  
Vergleich zwischen der Toxinbildung auf KYG- und  
MK-Nährlösungen

Nährlösung	Aktivität des Kulturfiltrates nach 19 Tagen Kulturdauer im <i>Bacillus subtilis</i> -Plattentest. mm Hemmhofdurchmesser
K Y G - L ö s u n g (KNOPSche Lösung + 0,5 % Difco Yeast Extrakt + 2 % Glucose)	22,0
M K - L ö s u n g (KNOPSche Lösung + Extrakt von 1 % Malzkeimlingen + 2 % Glucose)	18,0

Übrigens mag es hier interessant sein, Parallelen zu den Ergebnissen der Infektionsversuche, wie sie im vorhergehenden Kapitel beschrieben wurden, zu ziehen. Sind nicht auch dort ganz spezielle Ernährungsansprüche von *Endothia parasitica* vorhanden? Diese Ernährungsansprüche sind sowohl in vivo als auch in vitro eher fakultativ; der Pilz vermag auch auf ungünstigen Medien zu persistieren, ja sogar pathogen zu wirken, doch wird er auf günstigeren Nährsubstraten zu unvergleichlich stärkerem Wachstum und zur Toxinbildung angeregt, kurz, zu einem enorm wirksamen pathogenen Agens gefördert.

## 2. Die Kulturdauer

**Versuchsfrage:** Welches ist die beste Kulturzeit für eine maximale Toxinproduktion? Welche Kulturart (Schüttel- oder Standkultur) eignet sich für die Toxinproduktion am besten?

**Versuchsanordnung:** 100 Erlenmeyerkolben mit KYG-Lösung wurden mit *Endothia parasitica* beimpft, so daß nach der Beimpfung in 1 ml Nährlösung 20 000 Sporen vorhanden waren. Sämtliche Kolben wurden vorerst eineinhalb Tage bei 27 ° C auf der „Hin-und-her“-Schüttelmaschine (100 Schwingungen je Minute) zum Auskeimen gebracht, sodann 50 Kolben auf der rotierenden Schüttelmaschine (150 Drehungen je Minute) und die bleibenden 50 Kolben im gleichen Raum bei 21 ° C als Standkultur gehalten. Die

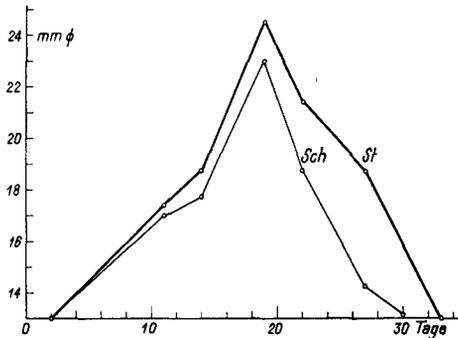
Kulturen wurden während 30 Tagen verschiedentlich kontrolliert und ausgetestet.

**Versuchsergebnisse:** Die Ergebnisse sind in Abb. 14 dargestellt. Verglichen mit den Ergebnissen von Abb. 15 und 16 ist zu bemerken, daß die Inokulummenge hier sehr günstig gewählt wurde, so daß ein Einfluß von dieser Seite nicht ins Gewicht fällt.

Abb. 14. Die Beziehung der Toxinproduktion von *Endothia parasitica* zur Kulturdauer (in Stand- [St] und in Schüttelkultur [Sch]), ausgedrückt in *Subtilis*-Aktivität des Kulturfiltrates.

Abszisse: Tage Kulturdauer.

Ordinate: Hemmung von *Bacillus subtilis* im Filterscheibentest (mm)



### 3. Die Abhängigkeit der Toxinausbeute von der Inokulummenge

**Versuchsfrage:** Welches ist die günstigste Inokulummenge zur Erzielung einer maximalen Toxinausbeute?

**Versuchsanordnung:** Es wurden 100 Erlenmeyerkolben (500 ml), welche je 100 ml KYG-Lösung enthielten, mit verschiedenen Sporenmengen beimpft, so daß

20 Kolben	2 600 000
20    "	430 000
20    "	70 000
20    "	12 000
20    "	2 000 Sporen je ml beimpfter

Nährlösung enthielten. Von jeder Stufe wurden zehn Kolben in Stand- und die restlichen in Schüttelkultur (rotierende Schüttelmaschine mit 150 Umdrehungen je Minute) bei 21 ° C inkubiert. Nach verschiedenen Tagen Kulturdauer wurde mittels des *Bacillus subtilis*-Plattentest kontrolliert.

**Versuchsergebnisse:** Die Ergebnisse sind in Abb. 15 (für Standkultur) und in Abb. 16 (für Schüttelkultur) gezeigt. In beiden Fällen wurden die besten Werte mit etwa 70 000 Sporen je ml beimpfter Nährlösung erzielt. Die Verschiedenheit der Kurvenbilder dieser beiden Kulturarten ist auffallend. Die Standkulturen zeigen eindeutig größere Ausgeglichenheit. Auch ist dort sehr deutlich sichtbar, daß mit zunehmender Inokulummenge das Optimum der Toxinproduktion in einem früheren Zeitpunkt der Kulturdauer erreicht wird. Bei der Schüttelkultur liegen die Verhältnisse etwas anders; dort verzögert sich die Toxinbildung (Toxinanreicherung) sowohl bei zu wenig als auch bei zuviel Inokulum, während bei der optimalen Sporenmenge eine ausgeprägte Spitze in der Diaporthinanreicherung in Erscheinung tritt.

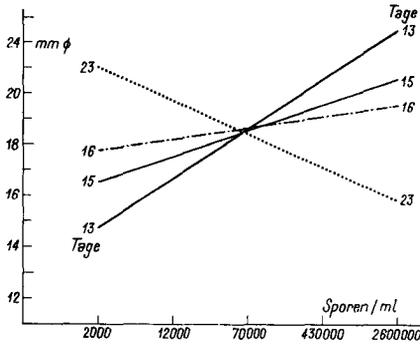


Abb. 15. Die Abhängigkeit der Toxin-  
ausbeute von der Inokulummenge, aus-  
gedrückt in *Subtilis*-Aktivität des Kultur-  
filtrates der Standkultur.

Abszisse: Inokulummenge je ml beimpfter  
Nährlösung.

Ordinate: Hemmung von *Bacillus subtilis*  
im Filterscheibchentest

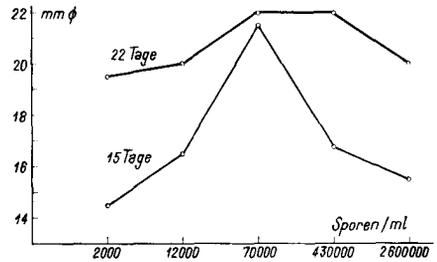


Abb. 16. Die Abhängigkeit der Toxin-  
ausbeute von der Inokulummenge, aus-  
gedrückt in *Subtilis*-Aktivität des Kultur-  
filtrates der Schüttelkultur.

Abszisse: Inokulummenge je ml beimpfter  
Nährlösung.

Ordinate: Hemmung von *Bacillus subtilis*  
im Filterscheibchentest

#### 4. Die Abhängigkeit der Toxinproduktion von der Temperatur

Versuchsordnung: Die Toxinproduktion ist in den verschiedenen Wachstumsstadien unterschiedlich. In einem geschlossenen Ernährungssystem mit nicht kontinuierlichem Nährstoffnachschub werden die verschiedenen Nährelemente allmählich verbraucht. Das Wachstum des Pilzes ist so lange progressiv, bis eines der „Elemente“ ins Minimum gerät; dann wird das Wachstum eingestellt, und später beginnt eine Autolyse. In einem solchen geschlossenen Ernährungssystem setzt die Toxinproduktion von *Endothia parasitica* am Ende der progressiven Wachstumsphase ein (Abb. 18). Kultiviert man *Endothia* bei verschiedenen Temperaturen, so ist zu einem bestimmten Zeitpunkt die Wachstumsphase in den einzelnen Temperaturstufen verschieden weit fortgeschritten, und dementsprechend wird auch die Toxinproduktion anders sein. Ihre Abhängigkeit von der Temperatur kann also auf diese Weise nicht gemessen werden, da wir ein verfälschtes Bild bekommen. Um trotzdem einige Aufschlüsse zu erhalten, wurde der Versuch folgendermaßen angeordnet:

220 Erlenmeyerkolben (500 ml) mit je 100 ml KYG-Nährlösung wurden mit *Endothia parasitica* beimpft, einen Tag bei 27 ° C auf der „Hin-und-her“-Schüttelmaschine (100 Schwingungen je Minute) geschüttelt. Hernach wurden 110 Kolben in die elf Thermostaten von 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 ° C verteilt. Die restlichen 110 Erlenmeyerkolben wurden in Standkultur noch weitere sechs Tage bei 27 ° C gehalten und erst dann in die erwähnten Thermostaten gestellt. Die erste 110-Kolben-Serie wurde als Reihe I und die zweite 110-Kolben-Serie als Reihe II bezeichnet. Bei Reihe II wuchs also der Pilz in optimaler Temperatur, bis sich ein kompaktes Oberflächenmycel gebildet hatte und die Toxinproduktion soeben einzusetzen begann. Erst

nach diesem Zeitpunkt wurde diese Reihe II in die Thermostaten verteilt. Reihe I wurde dagegen direkt nach der Beimpfung und nach dem Auskeimen der Sporen in die verschiedenen Temperaturen gebracht. Reihe I zeigt uns eine Produktionskurve, die wachstums- und temperaturbedingt ist, während die Kurve von Reihe II ein durch das Wachstum weniger verfälschtes Bild ergibt.

Die Aktivität wurde zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen (*Bacillus subtilis*-Test), wobei man immer das Kulturfiltrat von fünf Kolben des gleichen Thermostaten verwendete ( $5 \times 1$  ml : Lösung zweimal getestet).

**Versuchsergebnisse:** Die Ergebnisse dieses Temperaturversuches sind aus Abb. 17 ersichtlich. Verbindet man die Optima der verschiedenen Kurven miteinander, so kann deutlich ihre Verschiebung bei zunehmender Kulturdauer nach den tieferen Temperaturen hin verfolgt werden. Reihe II zeigt dies ausgeprägter als Reihe I.

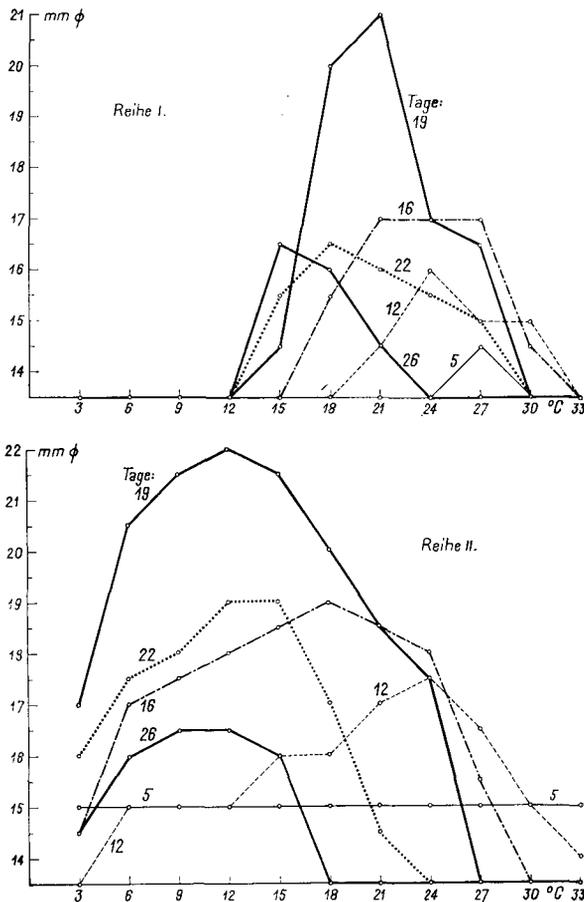


Abb. 17. Die Abhängigkeit der Toxinproduktion von der Temperatur. Die Verschiebung der Optima bei verschiedener Kulturdauer nach den tieferen Temperaturen hin kann besonders bei Reihe II gut verfolgt werden. Reihe I = Einwirkung der verschiedenen Temperaturen nach erfolgtem Auskeimen der *Endothia*-Sporen. Reihe II = Einwirkung der verschiedenen Temperaturen nach dem Zeitpunkt beginnender Toxinbildung.

Abszisse: Temperatur.

Ordinate: Hemmung von *Bacillus subtilis* im Filterscheibchentest. Die Kurven zeigen die Aktivität nach verschiedenen Inkubationszeiten

### 5. Die Beziehung zwischen pH, Wachstum und Toxinbildung

**Versuchsanordnung:** 90 Erlenmeyerkolben mit je 100 ml KYG-Nährlösung wurden mit *Endothia parasitica* beimpft und bei 21 ° C

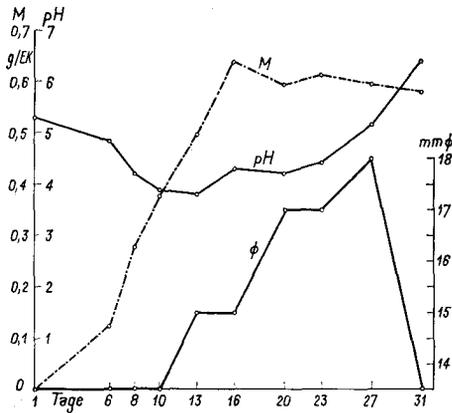


Abb. 18. Beziehungen zwischen pH, Mycelgewicht und Aktivität in *Endothia parasitica*-Kulturen.

Abszisse: Kulturdauer in Tagen.

Ordinate: Mycelgewicht (M), Wasserstoffionenkonzentration (pH), Aktivität im *Bacillus subtilis*-Test ( $\phi$ )

kultiviert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden je zehn Erlenmeyerkolben geerntet, das pH, die Aktivität (im *Bacillus subtilis*-Test) und das Mycelgewicht (Trockengewicht) bestimmt. Für die Trockengewichtsbestimmung wurde das Mycel sämtlicher zehn Kolben zusammen in einem Wägegölchen bei 60° C vortrocknet und sodann bei 103° C während drei Stunden nachgetrocknet. Nach der Abkühlung im Exsiccator wurde gewogen und das Myceltrockengewicht eines Erlenmeyerkolbens bestimmt.

Versuchsergebnisse:

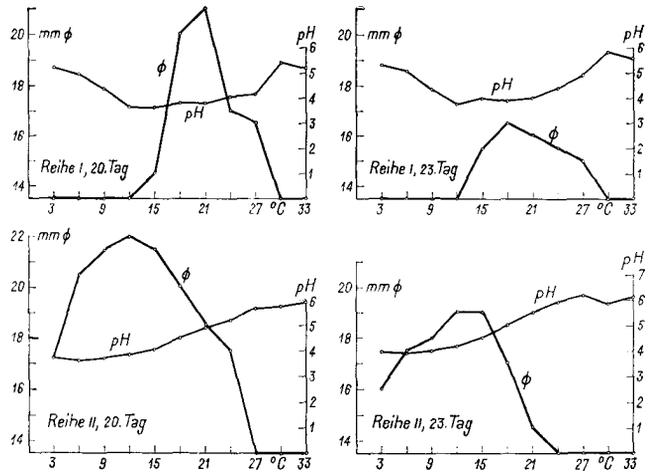
Die Ergebnisse sind in Abb. 18 gezeigt. Ein viel besseres Bild über die Beziehungen zwischen der Wasserstoffionenkonzentration der Kultur-

lösung und deren Aktivität ergibt jedoch Abb. 19. Diese Ergebnisse stammen aus Versuchen mit demselben Material, mit dem die vorher besprochenen Temperaturversuche durchgeführt wurden.

Abb. 19. Die Beziehung zwischen pH und Aktivität (*Bacillus subtilis*-Test) in Kulturlösungen eines Temperaturversuches. Bedeutung von Reihe I und II: siehe Abb. 17 und Text.

Abszisse: Temperatur.

Ordinate: Aktivität im *Bacillus subtilis*-Test ( $\phi$ ), Wasserstoffionenkonzentration (pH)



### 6. Die Toxinproduktion bei verschiedenen *Endothia*-Spezies

Versuchsordnung: Da nicht sämtliche zur Verfügung stehenden *Endothia*-Stämme und -Arten in meinen Kulturen Sporen bildeten, muß dieser Versuch (da nicht mit den genau gleichen Inokulumengen gearbeitet werden konnte) rein qualitativ betrachtet werden (aus diesem Grunde

wird auch auf eine quantitative Angabe der Toxinproduktion verzichtet). — Verschiedene *Endothia parasitica*-Isolationen, und zudem *Endothia viridistroma* und *Endothia gyrosa*, wurden verwendet. Während der Kulturdauer wurde zu verschiedenen Zeitpunkten getestet (*Bacillus subtilis*-Plattentest).

Versuchsergebnisse: Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 gezeigt. *Endothia parasitica*-Isolationen Clinton und Heald sind beides Stämme, deren Vitalität durch langjährige künstliche Kultur stark herabgesetzt ist. Wahrscheinlich ist deshalb auch ihre Toxinproduktion geringer.

*Endothia viridistroma* und *Endothia gyrosa* bildeten in diesen Versuchen kein Toxin. Ein Beweis für diesen negativen Befund müsste allerdings erst noch mit längeren Versuchen erbracht werden. Bis jetzt bleibt die Fähigkeit zur Diaporthinbildung auf *Endothia parasitica* beschränkt.

Tabelle 6

Die Toxinproduktion bei verschiedenen *Endothia*-Spezies

Verwendete <i>Endothia</i> -Spezies	Toxinproduktion	
	— = keine Aktivität	+ = Aktivität vorhanden
<i>Endothia viridistroma</i> Wehmeyer	—	
<i>Endothia gyrosa</i> (Schw.) Fr.	—	
<i>Endothia parasitica</i> (Murr.) And. (Isolation CLINTON)	—	
<i>Endothia parasitica</i> (Murr.) And. (Isolation HEALD)		+
<i>Endothia parasitica</i> (Murr.) And. (Isolation BALDACCI, Pavia)		+
<i>Endothia parasitica</i> (Murr.) And. (Isolation 2 SORESINA)		++
<i>Endothia parasitica</i> (Murr.) And. (Isolation 3 CORCAPOLO)		++
<i>Endothia parasitica</i> (Murr.) And. (Isolation von <i>Quercus</i> , NEGGIO)		++
<i>Endothia parasitica</i> (Murr.) And. (Isolation von <i>Fagus silvatica</i> L.)		++

### c) Die Isolierung des Toxins

Das Toxin kann auf verschiedene Weise aus dem Kulturfiltrat extrahiert werden. Es läßt sich beispielsweise mit verschiedenen Lösungsmitteln wie Benzol, Aether, Chloroform oder Essigester mit dem Scheidetrichter ausschütteln. Nach den bis jetzt vorliegenden Erfahrungen hat sich aber vor allem die Extraktion mit Aktivkohle bewährt. Das Kulturfiltrat wird mit 1 % Aktivkohle (Nuchar) während 15 Minuten mit einem Vibrator stark durchmischt. Nach erfolgtem Abfiltrieren wird die Kohle in einem Becherglas mit Methanol versetzt, 12 Stunden bei 15 ° C stehengelassen und sodann das Methanoleluat abfiltriert. Nach mehrmalig wiederholtem Eluieren wird die Kohle verworfen. Sämtliche Methanoleluate werden sodann zusammen in einem Rundkolben unter Vakuum vollständig eingedickt. Der Rückstand

wird gewogen und in  $H_2O$  dest. gelöst. Diese wäßrige Lösung mit bekannter Toxinrohextrakt-Menge kann direkt zum Testen verwendet werden. Empfehlenswert ist, für Tests immer frische Lösungen zu verwenden.

Dieser erste Rohextrakt kann nun weitergereinigt werden. Auf den speziell chemischen Teil der Arbeiten mit Diaporthin möchte ich nicht näher eingehen. Auf Grund des Welketests und des *Bacillus subtilis*-Plattentests führt Herr Dr. A. BOLLER unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. PL. A. PLATTNER (Hoffmann-La Roche, Basel) die weitere chemische Aufarbeitung dieses Stoffes aus; worüber in einer späteren Publikation berichtet werden wird.

#### d) Eigenschaften des Toxinrohextraktes

##### 1. Der Einfluß von Hitzeeinwirkung und pH-Veränderung auf die Aktivität des Toxinrohextraktes

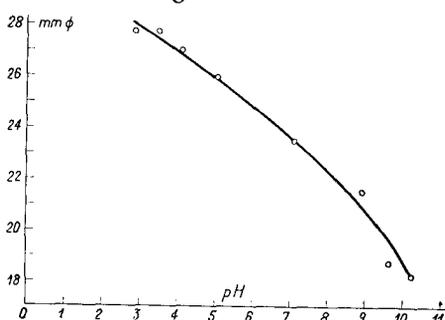


Abb. 20. Der Einfluß von pH-Veränderungen auf die Aktivität des Diaporthins im *Bacillus subtilis*-Plattentest.

Abszisse: Wasserstoffionenkonzentration.  
Ordinate: Hemmhofdurchmesser im *Bacillus subtilis*-Test

**Hitzeeinwirkung:** Eine wäßrige Toxinlösung wurde im Wasserbad während 15 Minuten gekocht und dann mit dem *Subtilis*-Test geprüft. Diese Behandlung bewirkte keinen Aktivitätsverlust.

**pH-Veränderung:** Die Wasserstoffionenkonzentration einer wässrigen Toxinlösung wurde durch Zugabe von KOH sukzessive verändert. Nach jeder pH-Messung mit dem Polymetron-Glaselektrodengerät wurden Proben für den *Bacillus subtilis*-Test entnommen. Die Ergebnisse sind aus Abb. 20 ersichtlich.

##### 2. Die Löslichkeit des Toxins

Wie schon erwähnt, eignen sich verschiedene organische Lösungsmittel sehr gut für diesen Stoff. So Benzol, Aether, Essigester, Chloroform, Butanol, Aethanol, Methanol, Aceton. In Petrolaether ist das Diaporthin nicht löslich; am selektivsten löst Benzol.

Für die biologischen Versuche erhält die Löslichkeitsfrage ihre besondere Bedeutung, da nur wäßrige Lösungen für die Tests gebraucht werden. Das Toxin ist unmittelbar nach dem Eluieren aus dem eingedickten Zustande sehr gut in Wasser überzuführen. Für unsere biologischen Versuche haben wir also vorderhand noch keine Löslichkeitsschwierigkeiten.

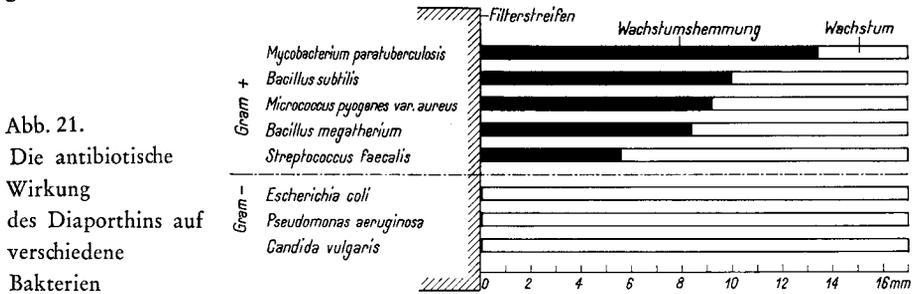
#### e) Die biologische Wirkung des Toxinrohextraktes

##### 1. Die Wirkung auf verschiedene Bakterien und Pilze

Nachdem es sich gezeigt hatte, daß das Diaporthin *Bacillus subtilis* stark hemmt, wurde versucht, durch ein sogenanntes Bakterienspektrum die Wirkung auf verschiedene andere Bakterien kennenzulernen.

**Versuchsordnung:** Filterpapierstreifen von 8 cm Länge und 1 cm Breite wurden mit der gleichen Menge Diaporthin getränkt und in die Mitte der Platten mit Nähragar gelegt. Hernach wurden die in Abb. 21 aufgeführten Testbakterien mit einer Öse senkrecht zum Filterstreifen gestrichen und bei 37° C inkubiert.

**Versuchsergebnisse:** Darstellung Abb. 21 zeigt, daß alle verwendeten grampositiven Bakterien gehemmt, alle gramnegativen aber im Wachstum nicht gestört wurden. *Candida vulgaris* wurde ebenfalls nicht gehemmt.



## 2. Die Wirkung des Diaporthins auf höhere Pflanzen

Die Wirkung des Toxins kann am besten an Hand eines Welketests mit Tomatenpflanzen, wie er im Kapitel „Testmethoden“ beschrieben wurde, illustriert werden. Für diesen Test verwenden wir sieben Verdünnungsstufen mit bekannten Toxinrohextraktmengen je ml Lösung. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse dieses Tests dargestellt.

Tabelle 7

Ein Beispiel der Wirkung des Diaporthins in den verschiedenen Stufen eines Welketests mit *Solanum Lycopersicum* L.

Teststufe	Aufgenommene Toxinmenge je g Pflanze in mg	Wirkung nach 24 Stunden
1	4	Stengel und Blätter total gewelkt
2	2	Stengel und Blätter total gewelkt
3	1	Stengel und Blätter total gewelkt
4	1/2	Stengel zu 90 % kollabiert (Abb. 22)
5	1/4	Stengel zu 50 % kollabiert
6	1/8	Stengel zu 10 % kollabiert
7	1/16	keine Wirkung

Blätter vollständig normal aussehend, frisch und turgeszent. Scharfe Abgrenzung zwischen nichtgeschädigtem und kollabiertem Stengelteil. (Geschädigter Teil in der Regel an der Basis, nicht geschädigter Teil blattwärts.)

Nach weiteren zwei Tagen beginnt auch eine Schädigung an den Blättern sichtbar zu werden. Eine genauere Betrachtung zeigt oft eine nachträgliche dunkle Verfärbung der Blattäderchen (Abb. 23), ein Zeichen dafür, daß sich das Toxin bis in diese Zonen verteilt hat. Die Toxinanreicherung war aber hier noch zu gering, um sofort einen sichtbaren Schaden zu verursachen.

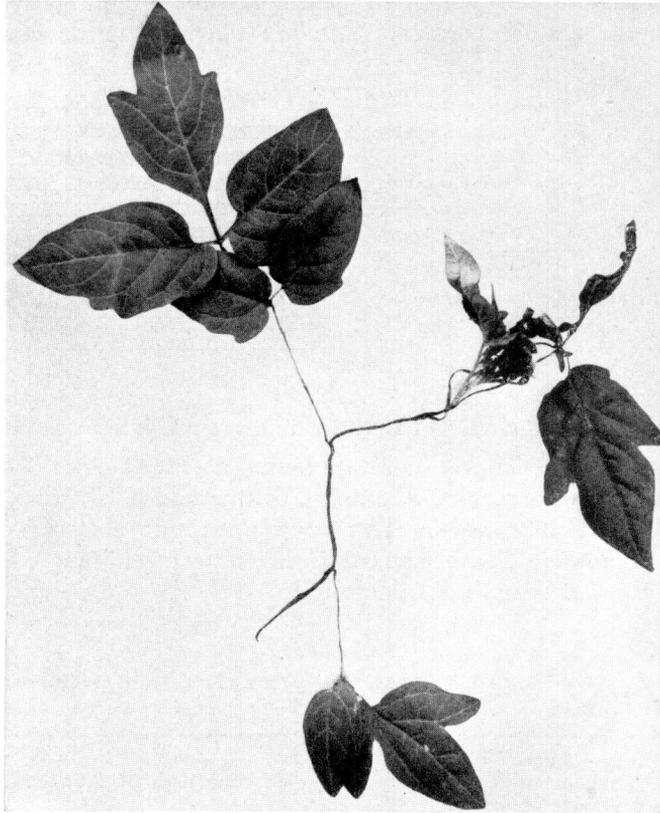


Abb. 22. Die Wirkung des Diaporthins im Welketest mit Tomatenpflanzen.

(Dieses Beispiel entspricht der Teststufe 4 in Tabelle 7)

(Aufnahme: Photographisches Institut, ETH, Zürich)

Ähnliche nachträgliche Verfärbungserscheinungen kann man auch in Welkeversuchen mit älteren Tomatensprossen feststellen. Dort kollabieren die verholzten Stengelpartien nach erfolgter Intoxikation nicht in dieser totalen Weise. Eine gewisse Stütz- und Trägerfunktion bleibt zudem noch erhalten. Festzustellen sind in diesem Falle mehr oder weniger starke Rillen (Abb. 24), welche sich ebenfalls nachträglich verfärben.

Die Intoxikationssymptome des Diaporthins und des Patulins sind sehr ähnlich. In beiden Fällen können Kollaps, Rillenbildung und Blattäderchen-

verfärbung an vergifteten Pflanzen beobachtet werden (MIESCHER 1950). Das Diaporthin unterscheidet sich vom Patulin jedoch ganz wesentlich in vielen chemischen Eigenschaften sowie auch in der biologischen Wirkung. Auf die Verschiedenheit der beiden Toxine möchte ich bei anderer Gelegenheit später näher eingehen.

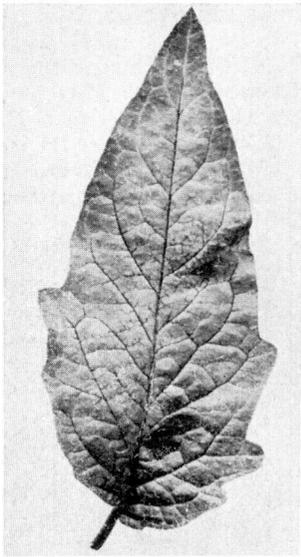


Abb. 23. Dunkel verfärbte Blattäderchen eines Blattes von *Solanum Lycopersicum* L. als nachträglich in Erscheinung tretendes Symptom bei Intoxikation mit Diaporthin. Dieses Bild gleicht sehr stark den Erscheinungen bei Patulinvergiftung.

Nat. Größe

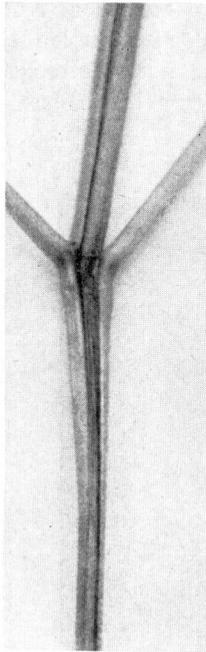


Abb. 24. Rillenbildung an einem Stengel eines älteren Tomatensprosses nach der Intoxikation mit Diaporthin. Ähnlich aussehende Rillenbildungen sind auch bei Patulinvergiftung

bekannt.  $\frac{2}{3}$  nat. Gr.

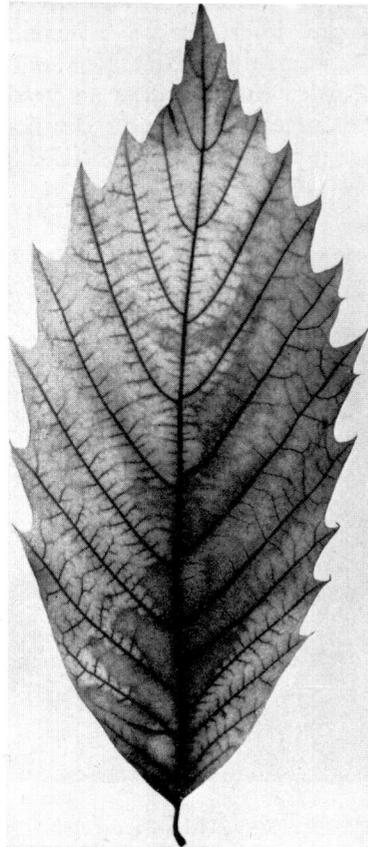


Abb. 25. Intoxikationssymptome des Diaporthins an einem Blatt von *Castanea sativa* Miller. (Verfärbung der Blattäderchen mit Nekrosen.)

$\frac{2}{3}$  nat. Größe

Die Wirkung des Diaporthins auf Kastanienpflanzen ist im großen gesehen identisch mit dessen Wirkung auf Tomatenpflanzen. Bei verholzten Pflanzen kann jedoch der ganze Vergiftungsvorgang im Stengel nicht in dieser Weise verfolgt werden. Als einzige Symptome sehen wir vorerst die Wirkung auf die Blätter. Diese zeigen (entsprechend den Versuchen mit Tomaten) ein rasches Welken des Blattes oder auch hier eine nachträgliche Verfärbung der Blattäderchen mit mehr oder weniger rasch sich ausdehnenden Blattnekrosen (Abb. 25). Die Inkubationszeit des Toxins, d. h. die Zeit, die zwischen der

Applikation des Giftstoffes und dem Auftreten der ersten Symptome liegt, ist bei Kastanienpflanzen bedeutend länger als bei Tomatenpflanzen.

Ein Versuch sei hier noch erwähnt, der gewisse Anhaltspunkte über die mengenmäßige Verteilung des Diaporthins in vergifteten Pflanzen geben kann. Hier wurden Tomatensprosse von verschiedenen Größen verwendet. Nach erfolgter Giftaufnahme und nach dem Auftreten der Welkesymptome wurden Stengelstücke an verschiedenen Stellen aus der betreffenden Pflanze herausgeschnitten und der Länge nach halbiert. Diese Fragmente wurden sodann auf *Bacillus subtilis*-Platten gelegt. Nach dem Inkubieren der Platten

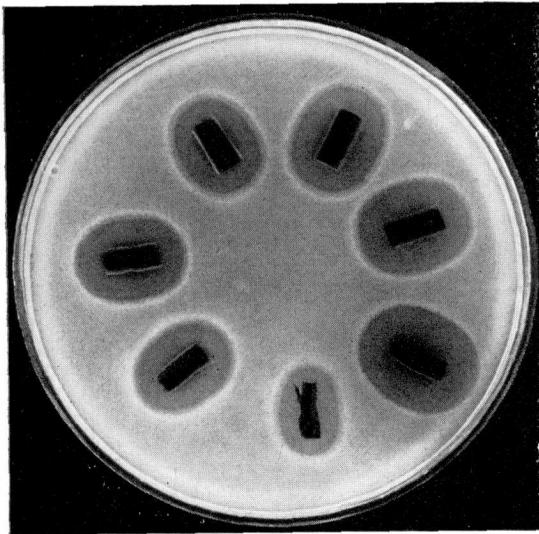


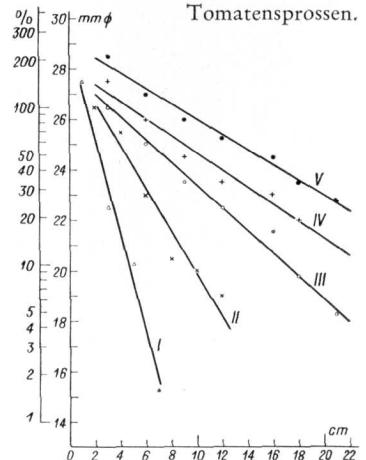
Abb. 26. Der Nachweis des Diaporthins in der gewelkten Pflanze. Stengelfragmente auf *Bacillus subtilis*-Platten mit den entstandenen Hemmungszonen.  $\frac{2}{3}$  nat. Größe

(Aufn.: Photographisches Institut der ETH, Zürich)

bei 37° C wurden die Hemmungswerte ermittelt (Abb. 26). Durch Umrechnung ist es möglich, einen annähernden Vergleich mit den Werten aus der Standardkurve (Abb. 10) zu ziehen und die Toxinmengen zu ermitteln. Auf diese Weise konnte das prozentuale Absinken des Toxinpiegels in der Pflanze ermittelt werden. In Abb. 27 sind die Toxinverteilungskurven von fünf verschieden großen Tomatensprossen dargestellt. (I: die kleinste Pflanze, etwa 7 cm lang; V: die größte Pflanze, etwa 25 cm lang.)

Ähnliche Versuche über die Toxinverteilung wurden auch mit gewelkten Kastanien- und *Quercus*-Zweigen durchgeführt. Die Ergebnisse sind im großen ganzen gleich wie bei den Versuchen mit Tomatensprossen.

Abb. 27. Die Toxinverteilung in 5 verschieden großen (I = 7 cm lang; II = 14 cm lang; III = 22 cm lang; IV = 25 cm lang; V = 25 cm lang), gewelkten Tomatensprossen.



Abszisse: cm Abstand des Stengel-fragmentes von der Basis.

Ordinate: Hemmhofdurchmesser in mm (*Bacillus subtilis*-Test); Toxinmenge in Prozenten

#### D. Zusammenfassung

1. Es wird gezeigt, daß *Fagus sylvatica* L. zum Wirtskreis von *Endothia parasitica* gehört.
2. Es besteht (wie an achtjährigen Kastanienpflanzen festgestellt werden konnte) keine Beziehung zwischen Alter bzw. Dicke eines infizierten Astes und der Läsionsgröße.
3. Das Alter des Inokulums spielt für das Gelingen der Infektion und besonders für die Erkrankung eine maßgebende Rolle. Mit zunehmendem Alter der Pilzkultur (auf Malzagar) wurde eine deutliche Virulenzverminderung festgestellt.
4. Es konnte gezeigt werden, daß ganz besonders Verletzungen, die bis aufs Kambium und in die inneren Rindenpartien reichen, für die Erkrankung weitaus am günstigsten sind. Dies ist besonders bei Quetschwunden (Hagelwunden, Schlagwunden usw.) der Fall.
5. In der Infektionsanfälligkeit der Kastanien gegenüber *Endothia parasitica* sind auffällige jahreszeitlich bedingte Schwankungen festzustellen. Am günstigsten für die Infektion scheint die Zeit während und unmittelbar nach dem Austreiben der Wirtspflanze zu sein. Am ungünstigsten ist der Spätherbst und Winter.
6. Auch in der Krankheitsanfälligkeit der Kastanien gegenüber *Endothia parasitica* respektive in der Proliferation des Erregers unter der Kastanienrinde sind jahreszeitlich bedingte Schwankungen zu beobachten. Das Zuwachsoptimum liegt in den heißesten Monaten des Jahres.
7. Eine Beziehung zwischen der Reaktionsweise der Kastanienpflanzen und der jeweiligen Läsionsgröße konnte nicht festgestellt werden.
8. *Endothia parasitica* (Murr.) And. ist imstande, ein Toxin zu bilden, das in der vorliegenden Arbeit *D i a p o r t h i n* genannt wird.
9. Die Bedingungen der Toxinbildung werden erläutert.
10. Eine Methode zur Isolierung des Diaporthins wird beschrieben.
11. Einige Versuche illustrieren die Eigenschaften des Toxinrohextraktes.
12. Die biologische Wirkung des Toxins auf Bakterien, Pilze und höhere Pflanzen wird beschrieben. Die fehlende Spezialisierung in der Wirkung gegenüber verschiedenen Pflanzen (Bakterien, Pilze und verschiedene höhere Pflanzen sprechen auf das Gift an) ermöglicht uns die Anwendung verschiedenster Tests für den Nachweis des Toxins.

## E. Literaturverzeichnis

- ANDERSON, P. J. and ANDERSON, H. W., 1912: *Endothia virginiana*. *Phytopath.* 2, 261—262.
- — and BABCOCK, D. C., 1913: Field studies on the dissemination and growth of the chestnut-blight fungus. *Penn. Chest. Bl. Com. Bul.* 3, 1—32.
- — and RANKIN, W. H., 1914: *Endothia* canker of chestnut. *N. Y. Cornell Agr. Exp. Sta. Bull.* 347, 531—618.
- BIRAGHI, A., 1950: Nuovi ospiti di *Endiotha parasitica*. *Ann. Sper. Agr. N. S.* IV, 1, 109—118.
- CLAPPER, RUSSEL, B.; GRAVATT, G. F. and STOUT, DOMALD, C., 1946: *Endothia* canker on Post Oak. *Plant Disease Reporter* 30, 10.
- CLINTON, G. P., 1912: The relationships of the chestnut blight fungus. *Science* 36, 907—914.
- DARPOUX, H., 1949: Le chancre du chataigner causé par *Endothia parasitica*. Institut national de la recherche agronomique. Document phytosanitaire 7.
- GÄUMANN, E., 1949: Die Pilze. Verlag Birkhäuser, Basel, 382 S.
- —, NAEF-ROTH, ST., REUSSER, P., AMMANN, A., 1952: Über den Einfluß einiger Welktoxine und Antibiotica auf die osmotischen Eigenschaften pflanzlicher Zellen. *Phytopath. Ztschr.* 19, 160—220.
- GRAVATT, G. F., 1949: *Unasylya* III, 1.
- GRAVES, A. H., 1950: Relative blight resistance in species and hybrids of *Castanea*. *Phytopath.* 40, 12, 1125—1131.
- GROSSER, A. und FRIEDRICH, W., 1947: Eine Testmethode zur Bestimmung von Pilzhemmstoffen. *Ztschr. f. Natur.* 2, 425—427.
- HEALD, F. D., 1943: Introduction to plant pathology. New York, 579 S.
- KOBEL, F., 1951: Untersuchungen über toxische Stoffwechselprodukte von *Nectria cinnabarina* (Tode) Fr. *Phytopath. Ztschr.* 18, 157—195.
- MIESCHER, G., 1950: Über die Wirkungsweise von Patulin auf höhere Pflanzen, insbesondere auf *Solanum Lycopersicum* L. *Phytopath. Ztschr.* 16, 369—397.
- MURRILL, W. A., 1906: A new chestnut disease. *Torreyia* 6, 186—189.
- NIENSTAEDT, H., 1953: Tannin as a factor in the resistance of chestnut, *Castanea* spp., to the chestnut blight fungus, *Endothia parasitica*. *Phytopath.* 43, 1, 32—38.
- REHM, H., 1907: *Ascomycetes* exs. Fasc. 39. *Ann. myc.* 5, 210.
- SHEAR, C. L., STEVENS, N. E. and TILLER, R. J., 1917: *Endothia parasitica* and related species. *U. S. Dept. Agr. Bull.* 380, 88 pp.

C U R R I C U L U M V I T A E

Geboren am 16. November 1921 in Poschiavo. Primarschule in Chur. Landwirtschaftliche Schule in Cernier. Landwirtschaftliche Praxis und Militärdienst. Herbst 1945: Aufnahmeprüfung an der Eidgenössischen Technischen Hochschule (ETH), Zürich; anschließend Studium an der Abteilung für Landwirtschaft. 1949 Abschluß des Studiums mit dem Diplom als Ing.-Agr. Seither im Institut für spezielle Botanik an der ETH bis 1951 als Doktorand und Assistent, dann als wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Dr. E. GÄUMANN und seit Frühjahr 1953 in der Eidgenössischen Anstalt für das forstliche Versuchswesen, Zürich, als wissenschaftlicher Mitarbeiter.

**ETH ZÜRICH**  
**BIBLIOTHEK**

Abt.	T	Nummer	U	Band	Teil	Aufl.	E	S
DI		2287					B	R*

BUCHKARTE

Bitte nicht herausnehmen!

34258



12/72

Leer - Vide - Empty